

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-502665
(P2003-502665A)

(43) 公表日 平成15年1月21日 (2003.1.21)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 3
33/15		33/566	
33/566		27/28	3 3 1 E
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-505179(P2001-505179)
(86) (22) 出願日 平成12年6月23日 (2000.6.23)
(85) 翻訳文提出日 平成13年12月25日 (2001.12.25)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 7 4 9 0
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 7 9 2 6 0
(87) 国際公開日 平成12年12月28日 (2000.12.28)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 4 0 , 7 1 0
(32) 優先日 平成11年6月24日 (1999.6.24)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(81) 指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P , U
S

(71) 出願人 セテック コーポレーション
アメリカ合衆国 01752 マサチューセツ
ツ州 マールボーロー シーダー ヒル
ストリート 260
(72) 発明者 ドナエフスキー, ユーリー, エム.
アメリカ合衆国 01760 マサチューセツ
ツ州 ナティック デービット ドライブ
10
(72) 発明者 ヒュース, ダラス, イー.
アメリカ合衆国 01581 マサチューセツ
ツ州 ウェストボーロー ウィンザー リ
ッジ ドライブ 2101
(74) 代理人 弁理士 秋元 輝雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検出可能な競合リガンドを使用した、親和性リガンドのスクリーニングに適したキャピラリー電気泳動法

(57) 【要約】

本発明は関心の標的に結合する未特定の親和性リガンドに関し複合材料をスクリーニングする、キャピラリー電気泳動をベースにした方法に関する。方法は標的と複合材料サンプルの混合体であるプラグ及び公知の強固に結合する競合リガンドのプラグを、キャピラリー電気泳動走行中にこれら2種類のプラグが混合する様に最適化される条件の下にキャピラリー電気泳動にかける。好ましくは、競合リガンドの移動が追跡される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】前もって選択される標的に結合する未特定の候補リガンドに関し複合材料をスクリーニングする方法であって、

（a）複合材料と所定濃度の標的との混合体を与え、さらに所定濃度の、標的に結合する既知、検出可能な競合リガンドを別に与えるステップと；

（b）検出器を有するキャピラリー電気泳動装置内に、分析体の第 1 プラグと分析体の第 2 プラグを連続的に注入するステップであって、分析体の第 1 及び第 2 プラグが、

（i）標的／サンプル混合体である分析体の第 1 プラグ、及び競合リガンドである分析体の第 1 プラグの組み合わせ；及び

（i i）競合リガンドである分析体の第 1 プラグ、及び標的／サンプル混合体である分析体の第 2 プラグの組み合わせ；

より成るグループから選択される組み合わせを含むステップと；

（c）未結合の競合リガンドと標的に結合した競合リガンド複合体を含むプラグより選択される少なくとも一部材を検出することに関し最適化される条件の下であって、第 2 プラグに由来する検出可能な分析体が第 1 プラグに由来する検出可能な分析体より早く検出器に向かい移動し、その結果キャピラリー電気泳動中に検出可能な分析体が検出器に到達する前に第 2 プラグが第 1 プラグを追い越す様に最適化されている条件の下に、第 1 及び第 2 プラグをキャピラリー電気泳動にかけるステップと；

（d）検出器にて競合リガンドを追跡し、キャピラリー電気泳動移動パターンを作成するステップと；

（e）ステップ（d）で得られる移動パターンが参照標準体と異なるか否か判定し、それにより複合材料中の候補リガンドの存在を指示するステップと、の各ステップを含む方法。

【請求項 2】前記参照標準体が：

（a）請求項 1 に使用されるものと同一の注入順番及びキャピラリー電気泳動条件を用い、複合材料を含まない所定濃度の標的のプラグ及び競合リガンドのプラグを連続的に注入するキャピラリー電気泳動と；

(b) 検出器に於ける競合リガンドの追跡と、
より得られる移動パターンを含むものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】前記第 1 プラグが標的／サンプル混合体であり、そして第 2 プラグが競合リガンドである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】前記競合リガンドが標的に比べ、検出器方向により早いキャピラリー電気泳動移動度を有している請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】前記第 1 プラグが競合リガンドであり、そして第 2 プラグが標的／サンプル混合体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】前記標的が競合リガンドに比べ検出器方向により早いキャピラリー電気泳動移動度を有している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】移動パターンが未結合の競合リガンドを表すピーク及び標的に結合した競合リガンドの複合体を表すピークを含むグループから選択される少なくとも 1 つのメンバーを含んでいる、請求項 1、2、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 8】標的が酵素、受容体、蛋白質、ポリペプチド、核酸、ポリヌクレオチド、炭水化物及びそれらの化学的、酵素的又は組換え的に変更される形を含むグループから選択されるメンバーを含み、前記変更形状が電気泳動特性の改良に関し変更されるものである、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 9】前記複合体材料が、コンビナトリアル化学物質ライブラリー、陸生植物抽出物、海洋植物抽出物、ヒトを含む高等動物由来細胞、真正細菌、放線菌、細菌、非組換え体又は組み換えた微生物抽出物、微生物発酵ブロス、真菌、原生動物、藻、古細菌、蠕虫、昆虫、海洋生物、海綿、珊瑚、甲殻類、ウイルス、ファージ、組織、器官、血液、土壌、海水、淡水界由来の水、腐植土、有機堆積物、堆肥、泥及び下水、又はそれらの部分的精製断片を含むグループより選択される、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 10】前記既知競合リガンドが標的に結合することが既知である天然に生ずる化合物、合成化合物、抗体、蛋白質、ペプチド及びオリゴヌクレオチドより成るグループより選択される、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 11】前記既知競合リガンドが蛍光検出器により検出可能である、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

(4)

【請求項 12】前記競合リガンドが約 $10\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$ の範囲内にある解離定数 (K_d)、及び約 $1.0(s-1)$ – $10(s-1)$ の範囲内にあるオフ速度 (K_{off}) を有している、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 13】前記競合リガンドの所定濃度が、少なくとも約 $5.0\ \mu\text{M}$ である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】前記既知競合リガンドが、約 $10\ \text{nM}$ – $10\ \mu\text{M}$ の範囲内にある解離定数 (K_d)、及び約 $0.010(s-1)$ – $1.0(s-1)$ の範囲内にあるオフ速度 (K_{off}) を有する、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 15】前記既知競合リガンドが、約 $K_d \leq 10\ \text{nM}$ の解離定数、及び約 $K_{off} \leq 0.01(s-1)$ のオフ速度を有する、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 16】前記所定標的濃度、所定競合リガンド濃度、及びキャピラリー電気泳動条件が、その他標的結合リガンドがない状態で、キャピラリー電気泳動移動パターン中に測定可能な変化を生じる様に事前に選択されている、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 17】前記測定可能な変化が、未結合の競合リガンドを表すピーク及び標的に結合した競合リガンドの混合体を表すピークを含むグループより選択される少なくとも 1 つのピークのピーク面積に於ける少なくとも 10 % の変化を含むものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】前記測定可能な変化が、未結合の競合リガンドを表すピーク及び標的に結合した競合リガンドの混合体を表すピークを含むグループより選択される少なくとも 1 つのピークのピーク面積に於ける少なくとも 50 % の変化を含むものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】前記測定可能な変化が、未結合の競合リガンドを表すピーク及び標的に結合した競合リガンドの混合体を表すピークを含むグループより選択される少なくとも 1 つのピークのピーク面積に於ける少なくとも 75 % の変化を含むものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】前記測定可能な変化が、未結合の競合リガンドを表すピークのピーク面積に於ける少なくとも 10 % の変化、及び標的に結合した競合リガ

ンドの混合体を表すピークのピーク面積に於ける少なくとも10%の変化を含むものである、請求項16に記載の方法。

【請求項21】前記キャピラリ電気泳動条件が、約 $10\mu\text{M}$ — $100\mu\text{M}$ の範囲内にある解離定数(K_d)、及び約 $1.0(\text{s}^{-1})$ — $10(\text{s}^{-1})$ の範囲内にあるオフ速度(K_{off})を有する候補リガンドが検出できる様に最適化されている、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項22】前記キャピラリ電気泳動条件が、約 10nM — $10\mu\text{M}$ の範囲内にある解離定数(K_d)、及び約 $0.01(\text{s}^{-1})$ — $1.0(\text{s}^{-1})$ の範囲内にあるオフ速度(K_{off})を有する候補リガンドが検出できる様に最適化されている、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項23】前記キャピラリ電気泳動条件が、約 $K_d \leq 10\text{nM}$ の解離定数、及び約 $K_{off} \leq 0.01(\text{s}^{-1})$ のオフ速度を有する候補リガンドが検出できる様に最適化されている、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項24】更に第1プラグ及び第2プラグの間にキャピラリ電気泳動ランニングバッファのプラグを注入することを含む、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項25】前記キャピラリ電気泳動が、約 $\text{pH}3$ — $\text{pH}10$ の範囲内にある pH 値を持つランニングバッファを用いて実施される、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項26】前記キャピラリ電気泳動が、約 $\text{pH}5$ — $\text{pH}8$ の範囲内にある pH 値を持つランニングバッファを用いて実施される、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項27】キャピラリ電気泳動が、約 0 — 500mM の範囲内にある塩濃度を持つランニングバッファを用いて実施される、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項28】キャピラリ電気泳動が、約 0 — 60°C の範囲内にある温度にて実施される、請求項1、3又は5に記載の方法。

【請求項29】キャピラリ電気泳動が、約 5 — 37°C の範囲内にある温度にて実施される、請求項1、3又は5に記載の方法。

(6)

【請求項 30】キャピラリ電気泳動が、約 0.5－60 分の範囲内にある走行時間実施される、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 31】キャピラリ電気泳動の開始点と検出器との間の距離が、約 0.5－1000 cm の範囲内にある、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 32】キャピラリ電気泳動が、約 0.5－1000 cm の範囲内にある長さを持つキャピラリの中で実施される、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【請求項 33】キャピラリ電気泳動がマイクロチップの導管内にて実施される、請求項 1、3 又は 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全てが参照されここに組込まれている1999年6月24日出願の米国特許出願番号第60/140,710号より優先権を主張するものである。

【0002】

研究開発に関する連邦政府の支援について

なし

【0003】

発明の背景

本発明は、関心の標的分子に結合できる未特定化合物に関する、キャピラリ電気泳動をベースとした物質スクリーニングの分野に関する。

【0004】

新規の、生物学的活性化合物を同定するスクリーニング法を開発することは、複雑な物質、特に“複合生物学的物質”：生物学的システムに効果を有する物質をスクリーニングする場合に特に特異的であり困難な試みになることがある。複合物質の例には、天然に生ずる生物学的物質、天然産物又は抽出物；核種生物学的調整体；化学的混合体；純粋化合物のライブラリー；及びコンビナトリアルライブラリーの様な合成化合物が含まれるが、これらに限定されない。主なスクリーニングにまつわる問題としては、関心の標的分子に結合する化合物を見つける候補体を検出すること、特にスクリーニングサンプル中に低濃度に存在する候補体を検出すること；スクリーニング試薬を妨害する可能性のある未知化合物に関すること；及びスクリーニングサンプルについて更に研究する価値があるか決定することを含む。更に1種類又は複数の弱く競合する結合体が高濃度に存在する場合には、同一サンプル中に存在する低濃度の中ないし強く結合する親和性リガンドに由来するシグナルが覆い隠されることがある。

【0005】

この様に、新規の生物活性化合物及び潜在的制御化合物、特に重要代謝経路の

必須分子又は疾患に関係する分子と結合する化合物を発見するのに適した、迅速かつ経済効果的なスクリーニング手段に対する需要が依然存在している。更に、潜在的候補リガンドを含むことが特定される、及び／又は候補リガンドが検出される材料のサンプルを更に特性分析し、試験することに関する優先付けの方法に対する需要もある。本発明は、候補に成り得る、新規の生物活性化合物である未知または未特定リガンドを検出することでこの需要に応える。具体的には本発明は、選択される結合強度又は解離定数（例えば $K_d \leq 100 \mu M$ 、好ましくは $K_d \leq 10 \mu M$ ）を有する公知の、好ましくは検出可能な競合リガンドを用いることで、所望閾値又はそれ以上の相対結合力を有するリガンドをより良く特定する手段を提供する。これらリガンドを含むサンプルを特定すること、及び等級付けすることは得られる化合物を更に単離すること、及び特性分析のためにかける時間と資源の節約になる。最も安定なリガンドは治療、制御及び／又は診断用化合物及び薬物としてより効果的であり、そして価値がある。

【0006】

発明の概要

本発明は、天然に生ずる複合生物材料、化学物質混合体、合成化合物及びその他の物質の様な、関心の標的分子に結合する候補親和性リガンド（例えば病気に関係する分子）に関する、新規の生物学的に活性な化合物を特定する方法を提供する。この様な候補リガンドは制御、医薬品、治療及び／又は診断応用の可能性を有している。本発明の方法は競合的結合候補体とキャピラリ電気泳動（CE）を組み合わせ、スクリーニングサンプル中に一定の選択強度、またはそれ以上の強度で標的に結合する未特定候補リガンドを検出し、そして候補リガンドの相対結合強度の特性分析を行う。方法は特に中度から強度に結合するリガンド（例えば好ましくは解離定数 $K_d \leq 100 \mu M$ 、好ましくは $\leq 10 \mu M$ 又はさらには $\leq 10 nM$ である）の検出に有用である。

【0007】

方法は、選択される標的分子（TG）及び公知、好ましくは標的（TG）に結合する中度ないし強度に結合する競合リガンド（CL）を使用し、TGに対する結合に関しCLと競合する候補リガンド（LG）を潜在的に含んでいるサンプル

、例えば複合生物材料をスクリーニングすることを含む。一般に、TG及びサンプルの混合体のプラグとCLの別のプラグは、未結合状態にあり／又は結合して複合体を形成している選択分子の移動を検出することに最適化される条件の下にキャピラリ電気泳動にかけられる。好ましくは、検出される、又は追跡される分子は公知CLであり、例えば蛍光又は吸光によりCE中に検出可能でなければならない。CE装置内の検出点にてCLを追跡することで、CLのキャピラリ電気泳動の移動パターン又はプロファイルが得られる。移動パターンは未結合競合リガンドを示すピーク及び標的に結合した競合リガンドの複合体を示すピークより成るグループに由来するメンバーを少なくとも1つ含む。好ましくは、両ピークは検出可能であり、候補リガンドを含まない。

【0008】

より具体的には、本発明は関心（例えば病気又は障害に関与するもの）の所定の標的に結合する未特定の候補リガンドについて複合材料をスクリーニングする方法を包含する。本方法は以下のステップを含む：

（a）複合材料と所定濃度の標的との混合体を与え、さらに所定濃度の、標的に結合する公知の検出可能な競合リガンド（好ましくは $K_d \leq 100 \mu M$ 、より好ましくは $K_d \leq 10 \mu M$ の解離定数を有する公知リガンド）を別に与えるステップと；

（b）検出器（好ましくは蛍光検出器）を有するキャピラリ電気泳動装置内に、分析体の第1プラグと分析体の第2プラグを連続的に行うステップであって、分析体第1及び第2プラグが以下より成るグループから選択される組み合わせを含むステップと；

（i）標的／サンプル混合体である分析体の第1プラグ及び競合リガンドである分析体の第1プラグの組み合わせ；及び

（ii）競合リガンドである分析体の第1プラグ及び標的／サンプル混合体である分析体の第2プラグの組み合わせ；

（c）第1及び第2プラグを、未結合の競合リガンド及び標的に結合した競合リガンド複合体を含むプラグより選択される少なくとも一部材を検出することに関し最適化される条件の下であって、第2プラグに由来する検出可能な分析体が第

1 プラグに由来する検出可能な分析体より早く検出器に向かい移動し、その結果キャピラリ電気泳動中に検出可能な分析体が検出器に到達する前に第2プラグが第1プラグを追い越す様に最適化されているキャピラリ電気泳動にかかるステップと；

(d) 検出器にて競合リガンドを追跡し、キャピラリ電気泳動移動パターンを作成するステップと；

(e) ステップ(d)で得られる移動パターンが参照標準と異なるか否か判定すること、それにより複合材料中の候補リガンドの存在を指示するステップ。

【0009】

別実施態様及び本発明の詳細について以下記載する。

【0010】

発明の詳細な説明

好都合には本発明は、高濃度の競合する弱結合型リガンドも同時に含む混合体中にある選択される標的に結合するリガンド、特に中ないし強く結合するリガンドの検出を可能にする。それだけでなく方法はスクリーニングされるサンプルについて、その中にある候補リガンドの具体的構造又は濃度についての知識を必要としない。方法はまたキャピラリ電気泳動中に直接検出できない標的を使用するスクリーニングアッセイも可能にする。

【0011】

一般に、本発明の方法は次のように実施される。所定濃度の関心の標的(TG)をまずスクリーニング対象となる複合体サンプルであり、標的と結合できる潜在のあるいは候補リガンドを1またはそれ以上を含む、又は含まない複合体サンプルと混合する。標的／サンプル混合体を十分な時間；例えば0.5－30分、好ましくは1－5分間インキュベーションし、標的及び何れかの候補リガンド(時に“TG/LG複合体”と呼ばれる)の複合体を形成させる。同時にキャピラリ電気泳動中に検出できる(例えば蛍光標識CL)所定濃度の公知競合リガンド(CL)－即ち標的に結合すること、好ましくは中ないし強く結合すること(例えば、 $K_d \leq 100 \mu M$ 、より好ましくは約 $\leq 10 \mu M$ の解離定数を有する)が公知であるリガンドを別に調整する。CLは以下のキャピラリ電気泳動(CE)

ステップ中に標的への結合を巡りスクリーニングサンプル材料中にある候補LGと競合する。

【0012】

標的／サンプル材料混合体及び検出可能な競合リガンド（CL）液調整後、各プラグは連続的にキャピラリー電気泳動装置のキャピラリーに注入される。注入の順番は選択したCE条件下でのCL及びTGの相対CE移動速度に依存する。方法の実施に於いても、CL及びTGの両方に電荷を付与するキャピラリー電気泳動（CE）ランニングバッファを使用する。ランニングバッファはTG／サンプル及びCLプラグを分離するためにプラグ間に随意に行われる。一般的に、検出対象しなければならない候補リガンドの親和性が高い程、プラグ間のランニングバッファ注入量は大きくなる。即ち、候補リガンドの相対親和性は、各リガンドサンプルを使ったスクリーニングプロトコルを繰り返すこと、及び第一プラグと第2プラグ間に注入されるランニングバッファ量を変化させること（即ち第2プラグが移動した距離、即ち2プラグが混合するまでの時間間隔を変化させること）で決定できる。

【0013】

TG／サンプル及びCLプラグを注入した後、TG及びCLを検出器に向かわせ、通過させる移動を誘導するのに適した量の電圧を加える。本スクリーニング法を実施するためには、CE実施中に2番目に注入されるプラグに由来する検出可能な分析体が最初に注入されるプラグに由来する検出可能分析体より早くCE装置に取り付けられる蛍光検出器に向かって移動し、その結果いずれかのプラグに由来する検出可能な分析体がキャピラリー内の検出点に到達する前に第2プラグ由来の検出可能分析体が第1プラグに由来する検出可能分析体を追い越し、混合する様にCE条件を選択することが重要である。

【0014】

用語“検出可能な分析体”は第1には競合リガンド（CL）及び標的（TG）だけでなく、サンプルに由来する候補リガンド（LG）も意味する。CLは検出器により直接検出されるが、TGはそれがCLと結合してCL／TG複合体を示すCEの移動ピークのシフトを与えることで間接的に検出される。LGの存在は

、本開示の他所にて論ずるようにCL/TG複合体形成の妨害を介して間接的に検出される。キャピラリ電気泳動分野の当業者は、第1プラグ由来の検出可能分析体に比べ、第2プラグに由来する検出可能分析体は検出器方向のキャピラリ電気泳動移動度が大きくなければならないことを認識するだろう。

【0015】

例えば、CL分析体のプラグを標的(TG)を含む第1プラグ後の第2プラグとして注入した場合、未結合型CLが未結合型TGより早く移動し、その結果後から注入される第2プラグに由来するCL分析体分子がTG含有プラグを追い越し、CE実施中に遊離型又は未結合型TG分子とCLが複合体を形成できることが重要である。TG含有第1プラグはTG/サンプルプラグ(スクリーニングプロトコールの場合)又は標的単独のプラグ(コントロール又は参照標準体を測定する場合)であろう。

【0016】

TGを含む第2プラグの前にCLプラグを最初に注入する場合には、TG分析体がCL分析体より高いキャピラリ電気泳動移動度を有していること、そしてその結果TGを含む第2プラグ由来のTG分析体がCLを含む第1プラグに由来する分析体を追い越し、相互作用することが重要である。

【0017】

好ましくは、公知の検出可能な競合型リガンドはCE中に検出器に捕捉され、その移動が追跡されることでキャピラリ電気泳動移動パターン又はプロファイルが作成される。CE移動パターンは以下の両方を含まないとしても少なくとも一方を含む：未結合型(遊離型)CLのピーク及びCL/TG複合体のピーク。例えば、CLは蛍光標識でき、それによりCL及びCL/TGピークはレーザー誘導蛍光検出によりモニタリングできる。CE中に未結合型CL及び結合型CL/TG複合体の両方を観察できるCE条件を利用することは有益であるが、本スクリーニング法の実施についてはCEプロファイルないにある一方又はもう一方のピークのみ観察する必要がある。本発明により実施される大部分のスクリーニングでは、キャピラリ電気泳動ピークは2個観察されるだろう；1つはCL/TG複合体に相当し、もう一方はいずれかの未結合型CLに相当するだろう。

【0018】

通常各プラグ中のCL及びTGの濃度は、以下詳細論ずるようにCE中にその他の標的結合リガンドが存在しない状態でTGに結合したCLの検出可能な割合を提供することに最適化されている。当業者は、その他リガンドがない状態でTGと複合体形成するCLの所望量に対応する所望のキャピラリ電気泳動プロフィール又は移動パターンを得るには、どの様なCLに対するTG濃度比を使用するか容易に理解するだろう。例えば、標的が単一のCL結合部位を有し、そして検出可能な強固に結合する競合リガンドの場合、その他リガンドが存在しない条件にてCLの少なくとも90-95%がTGに結合することを所望する場合には、それぞれ当モル濃度を使用することが好ましい。

【0019】

一般に、新規の親和性リガンドに関し複合体材料をスクリーニングすることを目的に本発明の方法を実施するためには、公知の競合リガンドはCE中に検出可能であり、そして選択される標的と安定に結合してLC/TG複合体を形成し、生じたCEの移動パターンが未結合型CL単独のCEプロフィールと異なっていないなければならない。CL/TG複合体の形成は未結合型又は遊離型CLピークの領域内に少なくとも1つの検出可能な減少を生じなければならず、そして絶対ではないが別のCL/TGピーク内を生じることが好ましい。絶対ではないが、好ましくはCLと標的の濃度及びCE運転時間は、CLプラグがCE中に標的含有プラグと混合するのに十分な時間であり、かついずれか又は両方のプラグがCE装置内の検出点に達するまでの時間であることが好ましい。最低でもCE中にCL及び標的が相互作用可能な濃度と時間とは、全標的及びCLが未結合型CLの移動ピークと区別できる検出可能な移動ピークを有する標的/CL複合体を形成するのに十分なものでなければならない。換言すれば、所定の標的濃度、所定の競合リガンド濃度及びキャピラリ電気泳動条件は、他の標的結合リガンドが無い条件で方法のステップにより作られるキャピラリ電気泳動移動パターン中に測定可能な変化を生ずる様に選択される。測定可能な変化には未結合型競合リガンドを表すピーク及び標的に結合した競合リガンドの複合体を表すピークを含むグループより選択される少なくとも1つのピークのピーク域に、少なくとも10%、

好ましくは少なくとも50%、好都合には少なくとも75%の変化を含む。

【0020】

候補親和性リガンド(LG)、具体的には中度から強固に結合するLG(例えば $K_d \leq 100 \mu M$ 、好ましくは $\leq 10 \mu M$)が複合体材料のサンプル中に存在する場合、検出可能な遊離型又は未結合型CLのピークは増加するだろう(その他標的結合リガンドが存在しない状態で、TG及びCLプラグ単独のコントロールCE測定から得た移動パターンに比べ)。従って、検出可能なCL/TG複合体ピークは、参照又はコントロールのCE測定からの移動パターンに比べ面積は減少するだろう。これは、CE中LGがTGへの結合を維持し、CLがTGに結合できず、CLプラグがTGとLGを含有サンプルの混合体のプラグを通過し移動するためである。両ピークを検出することは有益であるが、CE中いずれか一方のピークのみ、好ましくは未結合型又は遊離型CLのピークのみの観察が求められる。

【0021】

候補LGを含むサンプルをスクリーニングする場合、CL/TG複合体ピークの減少はTGに対するLGの親和性と生物学サンプル中のLG濃度の両方に依存する。従って、TG及びCLプラグ間の相互作用を許す時間を含むCE条件を調節し、所望強度又は親和性以上でTGに結合するLGの存在の検出容易にすることができる。

【0022】

弱く結合するリガンド、または低濃度の候補リガンドを検出するためには、強固に結合するCLのプラグとTGを含むプラグとの相互作用の時間を制限する様にCE条件を制御し、形成されるTG/弱結合IG複合体の少なくとも一部が検出できる様にアッセイ感度が調節されるだろう。アッセイ感度を下げること、及びそれにより強固に結合する標的のみの検出を制限することは、CLが標的に接触するまでの時間を長くすることで達成される(TG/サンプルプラグとCLプラグの注入の間隔を更に広げるか、TG及びCEに相当する電荷対質量比に焦点を当て適当なCE条件を選択することによる)。この様な時間の増加は弱く結合するLG/TG複合体に、CE中にTG及びCLが相互作用する前により多くの

解離するための時間を与えるだろう。即ち、標的は競合リガンドとの結合に関し自由になる。CLを追跡する場合、これはCE中により大きなCL/TG複合体ピーク及び／又は未結合同型CLピークの減少をもたらすだろう（スクリーニングサンプル中の強固な結合体がないことを示している）。

【0023】

キャピラリー電気泳動中に検出可能なCLの移動を追うことにより、本発明はキャピラリー電気泳動中それ自体は検出可能でない標的に対する候補リガンドを好都合にスクリーニングできる様にする。この様な検出不可能な標的は、例えば容易に精製されない、又は比較的不溶性である膜結合蛋白質受容体である。

【0024】

この方法の参照標準体は、複合材料のサンプルをスクリーニングする場合のプロトコールと同一の注入の順番、及びキャピラリー電気泳動条件を用い、複合材料を含まない標的プラグとCLのプラグを連続注入するキャピラリー電気泳動より生じたCLの移動パターンを含む。

【0025】

検出方法はキャピラリー電気泳動分野の当業者にとって公知であり、蛍光、紫外線吸収等を含むが、これらに限定されない。好都合且つ簡便な検出手段は、CE中に追跡される分子上に蛍光標識体を使用することである。

【0026】

本発明の方法は、容易かつ迅速に、複合生物材料サンプル中にある中から強固に結合したリガンド又は該当化合物を検出し、同定し、そして特性分析するのに使用できる（例えば、天然中秋物または合成化合物混合体）。本法は、たとえスクリーニングサンプルが高濃度の弱く結合する候補リガンド又は該当体を含む場合に於いても、選択される所望標的に対し強固に結合する低濃度の該当化合物を上手く、選択的に検出するのに特に有益である。

【0027】

本発明によるスクリーニングを実施する前に、キャピラリー電気泳動の当業者により知られる様に、全てのCE条件は所望範囲の親和性を有する該当リガンドを検出するの合わせて最適化されなければならない。なにが弱く結合する該当化合

物であり(WB)、なにが強い結合親和性を持つリガンドであるかを決定するための基準を規定しなければならない。異なるリガンド又は該当化合物の相対的結合強度を決定するカットオフは、主にキャピラリの長さ、注入部位から検出器までの長さ、CE中の電圧及び温度、バッファ組成(例えばpH及び/又は塩濃度)といった要素により決まる。たとえ強結合体は、高温にてCEを実施することで見いだすことができる(例えば $>25^{\circ}\text{C}$)。

【0028】

本発明の方法は、スクリーニングサンプル中にある選択される閾値より高い結合強度を持つ候補該当化合物を特定すること、及びその相対結合強度を決定するのに特に有益である。“中から強固に結合する”リガンド、及び“弱く結合する”リガンドはより早いオフ速度(K_{off})とより高い解離定数(K_D)を有しており、キャピラリー電気泳動にて殆ど又は全く一緒に保持されない標的/リガンド複合体、即ち不安定でありCLと接触する前及び検出器に達する前に迅速に解離してしまう標的/リガンド複合体を形成する。これに対し、より強く、又は強固に結合するリガンドはより低い解離定数とより遅いオフ速度を有しており、それらがキャピラリー電気泳動中にCLと接触し、検出器を通過する時にも一般に結合を維持している標的/リガンド複合体を形成する。各結合強度を持つ典型的なリガンドは表1に示す特性を持つ。

【0029】

【表1】

表1

標的に対するリガンドの 相対親和性	おおよその K_d 範囲	おおよその K_{off} 範囲
非常に強固な結合	$\leq 10\text{ nM}$	$\leq 0.01\text{ (s}^{-1}\text{)}$
強固な結合	$\leq 10\text{ }\mu\text{M}$	$\leq 1.0\text{ (s}^{-1}\text{)}$
中ないし強固な結合	$\leq 100\text{ }\mu\text{M}$	$\leq 10\text{ (s}^{-1}\text{)}$
弱い結合	$> 100\text{ }\mu\text{M}$	$> 10\text{ (s}^{-1}\text{)}$

【0030】

キャピラリー電気泳動条件が選択される後には、スクリーニングそのものは候補

リガンド／標的複合体の解離速度が弱いリガンド／標的複合体と強いリガンド／標的との間で異なるという事実を利用する。即ち、CE条件を最適化することで、サンプルと標的との前CEインキュベーション中に形成される弱い候補リガンド／標的複合体を完全又は十分に解離し、公知競合リガンドに対する結合に関しCE中の標的分子を十分に遊離状態にし、検出可能にすることができる。同時にこれと同一に最適化されるCE条件は、前CEインキュベーション中に形成される強固の候補リガンド／標的複合体を結合した状態にし、遊離型標的の可用性を下げ、それによりTG／CL複合体の形成を減少させることができる。結果として、公知競合リガンドのCE移動パターンに生ずる変化により、強固に結合する候補体の存在が間接的に示される。

【0031】

方法の実施態様の1つは、弱く結合するリガンド（例えば、 $K_d > 100 \mu M$ の解離定数を有する）ものに優先して、中から強固に結合するリガンド（例えば、 $K_d \leq 100 \mu M$ 、好ましくは $\leq 10 \mu M$ の解離定数を持つ）を検出する。標的及び材料のサンプルがまず混合され、共にインキュベーションされ、サンプル中にある候補リガンド（LG）への標的の結合が行われる。続いて（1）標的／サンプル混合体のプラグ（未結合型TG、未結合型LG、及びLG／TG複合体を含む）；及び（2）CLを含むプラグのキャピラリへの連続注入が行われる。注入の順番は公知であるCL及びTGの相対CE移動度より決定されるだろう。幾つかの例では、CLプラグがまず注入される；その他の例では標的／サンプルプラグがまず注入される。幾つかの例では、CEランニングバッファプラグがTG／サンプルプラグとCLプラグの間に注入される。

【0032】

競合リガンドのCE移動を追跡する本発明による模範的スクリーニングは、次のステップを用い、以下の結果を得る；

1. 標的とサンプル複合材料の混合プラグを、キャピラリ電気泳動装置内に注入する。本例では、TGは負に荷電しており、比較的遅いCE移動度を有する。
2. その後CLプラグを注入する。本例では、CLは負に荷電しており、TGに比べ高いCE移動度を有する。

3. 電圧を加えるとサンプル中にある候補リガンドと未結合 (TG) であるか、又は結合であるか (LG/TG 複合体) に関わらず標的及び CL は CE 装置に設置される検出器に向かって移動する。検出器は蛍光検出器である。

4. CL は移動度が高いため、CE 走行中により遅く移動している TG に追いつき始める。

5. CE 走行中に TG/LG 複合体から解離した TG は、CL プラグが TG 含有プラグを追い越すときに CL と自由に結合する。LG との結合を維持している TG は CL との結合に与れない。

6. CL 濃度及び CE 条件 (CL 及び TG/サンプルプラグが混合するまでの相対時間を含む) は、LG/TG 複合体が中ないし弱く結合した (例えば解離定数 $K_d \geq 100 \mu\text{M}$ 、好ましくは $\geq 10 \mu\text{M}$) ものである場合には、CL が TG に追いつく前に弱い LG/TG 複合体の大部分が解離する様に設定することができる。遊離型又は未結合の TG は CL に結合し、大きな、検出可能な CL/TG ピーク、及び/又は低下した遊離型又は未結合型 CL のピークを与える。

7. LG/TG 複合体が中ないし強く結合した (例えば $K_d \leq 1 \mu\text{M}$) 場合には、複合体は CE 走行中に 1 つになり、CL と結合できる遊離型 TG はよりいっそう少ないだろう。即ち、CL/TG ピークは LG が存在しない場合にはコントロールに比べ低くなり、遊離型 CL ピークは大きくなるだろう。

8. 即ち、CL/TG 複合体ピークの低下と遊離型 CL ピークの増加は、標的に結合している少なくとも 1 種類の強結合型候補リガンド (LG) が存在し、それが CL の結合を妨げていることを示している。CL/TG シグナルがより高く、そして/又は遊離型 CL ピークが低いことは、弱く結合するリガンドが存在していることを示す。

【0033】

本法によりスクリーニング可能な模範的複合体材料には、天然に生ずる複合生物材料、化学的混合体及びコンビナトリアルライブラリーの様な合成化合物が含まれるが、これらに限定されない。天然に生ずる複合生物材料には天然抽出物を含み、複合生物材料はコンビナトリアル化学物質ライブラリー、陸生植物抽出物、海洋植物抽出物、ヒトを含む高等動物由来の細胞、ユーバクテリア、放線菌、

細菌、非組換え又は組換え微生物由来の抽出物、微生物発酵ブロス、真菌、原生動物、藻、古細菌、蠕虫、昆虫、海洋生物、海綿、珊瑚、甲殻類、ウイルス、ファージ、組織、器官、血液、土壌、海水、淡水界由来の水、腐植土、有機堆積物、有機肥料、泥及び下水、又はその部分精製断片を含むグループより選択される。複合材料は本法によるスクリーニングにかけられる前に希釈され、そして／又は断片される。

【0034】

本発明の方法に使用できる標的の例には、酵素、受容体、蛋白質、ポリペプチド、核酸、ポリヌクレオチド、炭水化物及び化学的、酵素的又は遺伝子組換的に修飾されるそれらの形状であって、前記修飾形状が変更され電気泳動特性が改善しているものを含むが、これらに限定されない。標的分子は精製形状である必要はなく、標的自体が公知競合リガンドとの結合に利用可能である限り例えば細胞抽出物又は超音波処理体の一部として与えることができる。例えば、標的は細胞膜内に固定されているG-蛋白質共役受容体（GPCR）でもよい。

【0035】

公知のCE-検出可能競合リガンド（CL）の例には、天然に生ずる化合物、合成化合物、抗体、蛋白質、ペプチド、オリゴヌクレオチド及び関心標的に結合することが公知であるその他薬物を含むが、これらに限定されない。競合リガンドは必要に応じ、分子に所望電荷を与えるために変更されるだろう。好ましくはCLは中から強固に結合するものであり、その解離定数は約 $K_d \leq 10 \mu M$ であり、オフ速度は約 $K_{off} \leq 1.0 (s^{-1})$ である。好都合には、 $K_d \leq 10 nM$ であり $K_{off} \leq 0.01 (s^{-1})$ のCLを使用してもよい。標的に対する弱い親和性を補うことを目的として、中から強固に結合するCLに使用される濃度よりも高い濃度で使用する場合には、弱結合型CL（例えば K_d が約 $10 \mu M - 100 \mu M$ の範囲であり、オフ速度が約 $1.0 (s^{-1}) \leq K_{off} \leq 1.0 (s^{-1})$ の範囲）を使用することができる。

【0036】

本発明の方法は、当分野公知の一般的なキャピラリ電気泳動装置を使用する。これらはキャピラリ又はそれぞれの中でCEを実行できる複数の導管を有するマ

マイクロチップを使用するだろう。好ましくは、CEキャピラリは約0.5–1000cmの範囲の長さを持ち、約10 μ m–250 μ mの範囲内の直径を持つ。典型的なマイクロチップの寸法は約0.5–20cmであり、そして約10 μ m–250 μ mの範囲の導管直径を有する。

【0037】

前記の如く、各種バッファ条件及びその他要素を調節することで本発明の方法に於いて所望感度を得ることができる、一例えば $K_d \leq 100 \mu M$ 、好ましくは $K_d \leq 10 \mu M$ 、更により選択的には $K_d \leq 10 nM$ を有するより強固に結合する候補リガンドの検出に好都合な感度を得ることができる。変更可能な要素には、キャピラリ長；CE開始点と検出器との間の距離；CE走行時間；CE中の電圧及び温度；及びそのpH及び／又は塩濃度（即ちイオン強度）の様なバッファ組成が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの例を以下示すが、本開示の観点において、キャピラリ電気泳動分野の当業者にとって追加変更は明らかであろう。

【0038】

バッファpH値は約pH3–10の範囲内になり、好ましくはpH5–8である。キャピラリ電気泳動電圧は約5–30kVの範囲内であろう。CEランニングバッファの塩濃度（例えばNaCl又はKCl）は、例えば約0–500mM、好都合には10–100mMの範囲で、特に蛋白質性標的に関し変えることができる。より高い塩濃度（例えば、約200mM–1Mの範囲）は、標的／リガンド複合体の安定化に役立つ傾向がある。従って、弱い結合を示すリガンドより強固又は強い結合を示す候補リガンドを検出する場合には、より低い塩濃度の使用が好都合である。

【0039】

TG–サンプルプラグとCLプラグが接触する前のCE走行時間を増やすことも、より強固な結合を示す候補リガンドの検出に有利である。例えばCE走行時間は約2.5–10.0分の範囲内であろう。同様に、キャピラリ電気泳動開始点と検出器との間の距離は約0.5–1000cmの範囲内であろう。

【0040】

CEが実施される温度も変えることができ、一般には約0-60℃、好都合には5-37℃の範囲内である。より高い温度（例えば約25-60℃）を使い、本スクリーニングアッセイの感度をより強固に結合する候補リガンドに限定することもできる。強固に結合したリガンド／標的複合体は一般には高温でも安定であり、そのため同温度では弱いリガンド／標的複合体に比べ解離する割合は小さい。

【0041】

本発明は、その全てが参照されここに取り込まれているHughesら、米国特許第5,783,397号に見られる様に、複合生物材料のスクリーニングに適した他のキャピラリ電気泳動法と直列して使用するか、又は比較することができる。

【0042】

更に、候補リガンドの濃度が公知である場合には本発明を用いてスクリーニングサンプル中の候補リガンドの相対結合強度又は親和性を決定することができる。相対親和性は、複数回のCE走行によりCLプラグがTG／サンプルプラグと接触し、混合する前の時間を変えること、そして各走行に観察されるCEピークの相対面積（未結合型CL及びTG／CL複合体を表す）を観察し、測定し、そして比較することで決定できる。

【0043】

更に、当業者は本スクリーニング法を当分野公知の断片、精製、及び／又は分析技術（液体クロマトグラフィー又はマススペクトロメトリー）と組み合わせ、スクリーニング法により複合材料サンプル中に検出される候補リガンドを単離し、そして特性分析できることを認識するだろう。

【0044】

実施例

本発明は以下の非限定的実施例により更に記載され、そのCEの結果は図1及び2に例示されている。図1及び図2は、本発明の方法により複数のサンプルをスクリーニングした複数の電気泳動像を重ねて示しており、各サンプルは異なる濃度の候補リガンドを含んでいる。X軸はCE走行の開始からの経過時間を表し

ており、Y軸は相対蛍光シグナル（即ち量）を表している。しかし、X軸及びY軸は各種条件下に観察される未結合CLピーク及びCL/TG複合体ピークの高さの違いを表すために、電気泳動像毎にオフセットされている。

【0045】

実施例1

図1は50nMの標的、即ち抗凝固蛋白質であるトロンピン（TG）をCEの前にまず5分間、各種濃度の試験候補リガンド：強結合型合成リガンド、ヒルログー1（hirulog-1）（D-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly)4-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu; $K_d \sim 2 \times 10^{-9} M$ ）をインキュベーションする実験を示す。同様に蛍光標識される強結合競合リガンド、1本鎖（ss）DNAオリゴヌクレオチド5'-フルオロセイン-GGTTGGTGTGGTTGG-3'（ $K_d = 3 \times 10^{-9} M$ ；以後"FCL"）を調整した。標的と候補リガンド（TG/LG）の混合体をまず10秒間CE装置に注入し第1プラグを与え、続いて第2プラグとしてFCLを10秒間注入した。

【0046】

約20kVの電圧を加え電気泳動を開始し、未結合の競合リガンド（FCL）と結合型FCL/TG複合体のピークを、レーザー誘導蛍光とキャピラリーに沿って存在する検出点に配置される蛍光検出器を利用し、CE中にモニターした。

【0047】

図1に示す電気泳動像を参照すると、標的/サンプル混合体中にヒルログー1（hirulog-1）が存在しない場合には未結合（遊離型）FCLのピークに加え大きなFCL/TG複合体ピークが観察される。試験候補リガンドであるヒルログー1の濃度を増すと、FCL/TG複合体のピークは低下し、未結合FCLの量が増加する。これはヒルログー1が前CEインキュベーション中に標的のFCL結合部位に結合し、CE走行中も結合を維持したため、ECLプラグがTG/サンプル混合体のプラグに追いつき、相互作用した時にFCLと結合できる未結合のTGの量が減ったためである。サンプル中にTGの濃度に等しい50nMのヒルログー1が存在する場合には、明らかに全てのTGがヒルログー1に

結合しており、その結果 FCL/TG 複合体のピークは完全に消滅し、未結合型 FCL のピークが出現した。

【0048】

実施例 2

図 2 は、弱く結合する試験候補リガンドであるヒルゲン (hirugen) (硫酸化チロシンを持つヒルジン (hirudin) の Gly-54-Leu-65 カルボキシル末端部デカペプチド; $K_d = 1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$) が高濃度に存在する場合でも、強固に結合する試験候補リガンドであるヒルログー 1 が検出されている実験を示す。ここでは CE の前に トロンビン 標的 (TG) は 5 分間、各種濃度のヒルゲン及びヒルログー 1 を含むサンプルとインキュベーションされる。これら 標的/サンプル混合体はそれぞれ次の様にして CE スクリーニング走行にかけられる。標的/サンプル混合体のプラグを CE 装置内に 10 秒間加圧注入し、第 1 プラグを与える。次に 100 nM の FCL の第 2 プラグを 10 秒間注入し、続いて約 20 kV の電圧を加え電気泳動を開始する。FCL 及び FCL/TG 複合体の CE 移動は、レーザー誘導蛍光によりモニターされる。この場合も FCL は TG に比べ高い移動度を示すことから、未結合型 FCL のピークは FCL/TG 複合体のピークより前に出現する (図 2 参照)。

【0049】

ヒルゲン又はヒルログー 1 が存在しない場合には、CE 中に早く移動する FCL がゆっくり移動する TG を追い越し、FCL が TG を通過するときに FCL/TG 複合体が形成される。これにより図 1、最上段のものに似た電気泳動プロフィール生じる (図 2 最上段) : 即ち未結合型 FCL ピークと FCL/TG ピークの両方が観察される。

【0050】

トロンビン 標的を CE の前に 10,000 nM のヒルゲンとインキュベーションすると、競合リガンド (FCL) の CE プロフィールに差は認められなくなる。これはヒルゲンが非常に弱く、前キャピラリンキュベーション中に形成されるヒルゲン/TG 複合体の大部分または全てが CE 走行中、FCL が TG に追いつき接触する前に解離したためである。換言すれば、これら条件下では、本法は比

較的弱く結合するリガンド、ヒルゲンに対し感受性ではない。

【0051】

しかし、方法は強固に結合する候補リガンドであるヒルロゲー1を検出する。ヒルロゲー1／TG複合体は十分に強く、CE中もFCLが標的に追いつくまで複合体を維持する。ヒルロゲー1／TG複合体が安定であることから、FCLに結合できるTGはより少ない。その結果FCL／TGのピークは低下する。電気泳動像に見られる様に、弱く結合するヒルゲンが1,000倍モルまで過剰に存在する場合でもヒルロゲー1シグナルを検出できる。

【0052】

示した様に本発明は、スクリーニングされるどのサンプルが弱く結合する化合物が高濃度に存在する状態で低濃度の強く結合する化合物を含んでいるかを決定するための方法を提供する。本法は、候補リガンドのこのような混合体を含むことが多い天然抽出物の様な複合混合体をスクリーニングする場合に好都合である。条件を調節し、異なるCE条件下にスクリーニング法を繰り返し、得られる電気泳動像を比較することで、標的に対するリガンドの相対的親和性を推定することもできる。変更可能な条件には、サンプル濃度又は希釈量、バッファのpH及び／又は塩濃度、CE電圧、キャピラリー温度及び第1及び第2プラグ間の時間間隔又は距離を含むが、これらに限定されない。

【0053】

本発明を模範的实施態様と結びつけ記載したが、当業者は上記明細書を読むことで、クレームにより規定される本発明の精神から解離することなくここに記した方法を実行することに関する各種変更又は等価置換を実施できるだろう。従って、本明細書により発行される特許により与えられる特許保護は、添付のクレーム及びその等価物によってのみ限定されるものである。

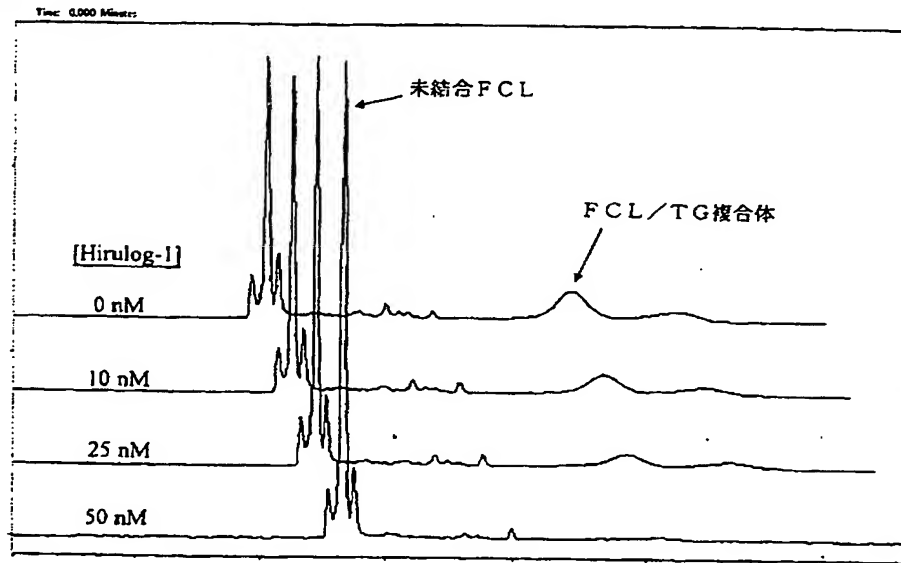
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の競合結合型CE方を用い、標的分子であるトロンビンに強く結合する試験候補リガンドであるヒルロゲー1を様々な濃度を含んだサンプルをスクリーニングし、得た複数の電気泳動像を重ねたものである；そして

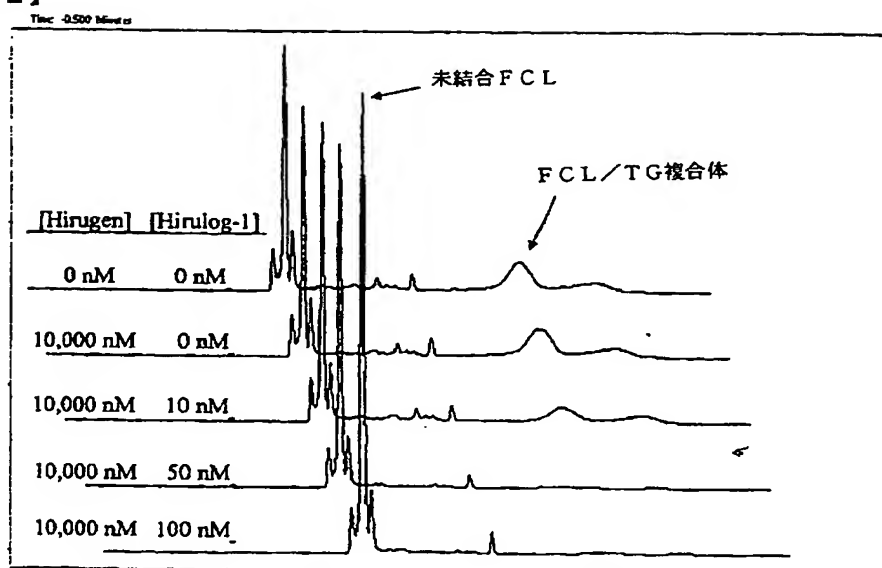
【図2】本発明の競合結合型CE方を用い、2種類の試験候補トロンビン結

合リガンド、弱結合型ヒルゲンと強結合型ヒルログー 1 を様々な濃度含んでいる
複数のサンプルをスクリーニングし、得た複数の電気泳動像を重ねたものである
。

【図 1】



【図 2】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/US 00/17490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 GOIN27/447		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 848 251 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 17 June 1998 (1998-06-17) abstract; figure 1	1
Y	WO 96 33412 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 24 October 1996 (1996-10-24) abstract	1
A	WO 98 32010 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 23 July 1998 (1998-07-23) abstract	1
A	WO 99 18438 A (ACLARA BIOSCIENCES INC) 15 April 1999 (1999-04-15) abstract	1
— — — — — — / —		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention can not be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 November 2000		Date of mailing of the international search report 24/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5516 Patenthaus 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2060, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3018		Authorized officer Duchatellier, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

(28)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/US 00/17490

C (Confirmation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 09185 A (LABINTELLIGENCE INC) 28 April 1994 (1994-04-28) abstract	1

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. App. Application No.
PCT/US 00/17490

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0848251	A	17-06-1998	NONE	
WO 9633412	A	24-10-1996	US 5630924 A EP 0821791 A JP 10512371 T US 5948231 A	20-05-1997 04-02-1998 24-11-1998 07-09-1999
WO 9832010	A	23-07-1998	US 5958202 A EP 0954749 A	28-09-1999 10-11-1999
WO 9918438	A	15-04-1999	AU 9673198 A EP 1029244 A US 6103537 A	27-04-1999 23-08-2000 15-08-2000
WO 9409185	A	28-04-1994	NONE	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ターコード (参考)
// C 1 2 N 15/09	Z N A	G O 1 N 27/26 C 1 2 N 15/00	3 3 1 K Z N A A
Fターム(参考)	2G045 AA40 DA36 FB05 GC15 4B024 AA11 CA01 HA11 4B063 QA18 Q021 Q042 Q079 QR56 QS16 QX02		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.